

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

Anmeldenummer: 80102252.6

Anmeldetag: 25.04.80

Int. Cl.³: **A 61 K 37/02**
A 61 K 37/26, C 07 C 103/52
C 07 G 7/00, C 09 K 15/14

Priorität: 30.04.79 DE 2917535
22.12.79 DE 2952119

Veröffentlichungstag der Anmeldung:
12.11.80 Patentblatt 80/23

Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE FR GB IT LI NL SE

Anmelder: **HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT**
Zentrale Patentabteilung Postfach 80 03 20
D-6230 Frankfurt/Main 80(DE)

Erfinder: **Thurow, Horst, Dr.**
Parkstrasse 20
D-6233 Kelkheim (Taunus)(DE)

Gegen Denaturierung beständige, wässrige Protein-Lösungen, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung.

Die Erfindung betrifft eine wässrige Proteinlösung, die zur Vermeidung der Denaturisierung der darin befindlichen Proteine an Grenzflächen eine oberflächenaktive Substanz mit kettenförmiger Grundstruktur enthält, deren Glieder schwach hydrophobe und schwach hydrophile Bereiche in alternierender Anordnung besitzen. Sie betrifft ferner die Behandlung von Oberflächen mit solchen oberflächenaktiven Substanzen und deren Verwendung zu der Handhabung und Reinigung von Proteinen. Das bevorzugte Protein ist Insulin.

EP 0 018 609 A1

Gegen Denaturierung beständige, wäßrige Protein-Lösungen,
Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung

Die Erfindung betrifft eine wäßrige Proteinlösung, die gegen Denaturierung der Proteine an Grenzflächen beständig ist, sowie Verfahren zur Herstellung einer solchen Lösung und zur Behandlung von Oberflächen, die auf Proteinlösungen
5 denaturierend wirken.

Es ist bekannt, daß gelöste Proteine an hydrophoben Grenzflächen (dazu gehört auch die Grenzfläche wäßrige Lösung/Luft) adsorbiert werden (C.W.N. Cumper und A.E. Alexander,
10 Trans.Faraday Soc. 46, 235 (1950)). Proteine sind amphiphile Substanzen, d.h. sie haben sowohl hydrophile als auch hydrophobe Bereiche. Die hydrophoben Bereiche bilden den Kontakt zur hydrophoben Grenzfläche.

15 Als Folge der Adsorption der Proteine an Grenzflächen werden verschiedene Sekundärreaktionen beobachtet, die man allgemein unter dem Begriff "Denaturierung" zusammenfaßt. Es kommt zu einer Formänderung der adsorbierten Proteinmoleküle (Änderung der Tertiär- und/oder Sekundärstruktur).
20 Daneben kann es zur Aggregation von adsorbierten Proteinmolekülen zu löslichen oder unlöslichen polymeren Formen kommen. So ist von vielen Proteinen eine Oberflächen-Aggregation bekannt, die sich z.B. als Trübung der Lösung oder als biologische Inaktivierung der Proteine beim Rühren oder
25 Schütteln der wäßrigen Lösungen bemerkbar macht (A.F. Henson, I.R. Mitchell, P.R. Mussellwhite, J. Colloid Interface Sci. 32, 162 (1970)). Diese Oberflächenadsorption und -aggregation ist besonders nachteilig in Apparaten zum Transport von Proteinlösungen z.B. in automatischen Dosiergeräten
30 für Arzneimittel. In einigen Fällen kommt es auch zu chemischen Reaktionen der adsorbierten Proteine mit gelösten Substanzen (F. MacRitchie, J. Macromol.Sci., Chem., 4, 1169 (1970)).

Das gilt insbesondere für Rinder-, Schweine-, Humaninsulin oder deren Des-B1-Phenylalaninderivate. Diese sind mit einem Zinkgehalt bis 0,8 % bezogen auf das Insulingewicht, in wäßrigen Medien unterhalb von pH 4,3 und oberhalb von pH 6,5 klar gelöst. Die genannten Insuline bilden in wäßriger Lösung Aggregate, so daß die Lösung einen Gleichgewichtszustand aus monomeren, dimeren, tetrameren, hexameren und oligomeren Insulinmolekülen darstellt. Es ist bekannt, daß Insulin an hydrophoben Oberflächen, wozu auch die Grenzfläche Lösung/Luft zählt, stark absorbiert wird (Weisenfeld et. al., Diabets 17, 766 (1968) und Browne et al., Eur. J. Biochem. 33 233 (1973)). Eigene Versuche haben ergeben, daß das absorbierte Insulin an der Oberfläche denaturieren kann. Dieser Prozeß wird durch Temperatur und Bewegung der Lösung beeinflusst. Das denaturierte Produkt wird als polymeres Aggregat wieder desorbiert und fällt bei einer genügend hohen Konzentration in der Lösung als Niederschlag aus oder bildet ein thixotropes Gel. Das denaturierte Insulin ist biologisch unwirksam und führt zu Verstopfungen von Förder-schläuchen, z.B. in einer kontinuierlich oder gesteuert arbeitenden Insulin-Infusionspumpe, wie sie in künstlichen Betazellen verwendet wird.

Daneben kann das denaturierte Insulin zu immunologischen Unverträglichkeiten Anlaß geben. Es sind Untersuchungen bekannt, die die physikalische Zustandsform von Insulin für die Bildung von Antikörpern gegen Insulin verantwortlich machen (Kumar et. al. Horm. Metab. Res. 6, 175 (1974)). Es ist darüber hinaus bekannt, daß selbst Humaninsulin, beim Menschen angewandt, zu immunologischen Reaktionen führen kann (A. Teuscher et. al., Diabetologia 13, 435 (1977)).

Nach dem Stand der Technik hergestellte wäßrige Insulinlösungen für therapeutische Zwecke können neben dem Wirk-

stoff, Rinder- oder Schweineinsulin oder einem Des-B1-Phenylalaninderivate dieser Insuline, gelöstes Zink bis zu 0,8 % bezogen auf das Insulingewicht, ein Mittel zur Einstellung der Isotonie, wie Natriumchlorid, Glycerin oder Glucose, ein Konservierungsmittel, wie Phenol, Kresol oder p-Hydroxybenzoesäuremethylester und ein Salz zur Pufferung des pH-Wertes, wie Natriumphosphat, Acetat oder Citrat enthalten. Daneben können noch Depothilfsstoffe, wie Protamin oder Surfen, zur Erzielung einer verzögerten Insulinwirkung zugesetzt sein oder die Lösungen sind mit kristallinen oder amorphen Depotformen des Insulins gemischt. Es wurde festgestellt, daß gelöstes Insulin in allen diesen Präparaten an Grenzflächen denaturiert.

Eigene Versuche haben ergeben, daß die Denaturierungsgeschwindigkeit mit der Temperatur, Bewegung der Lösung und dem pH-Wert der Lösungen anstiegen. Humaninsulin denaturierte in wäßriger Lösung ebenfalls. Zusätze, die die Aggregationsgleichgewichte des Insulins in wäßriger Lösung in Richtung des monomeren Moleküls verschieben, wie Guanidin, Harnstoff, Pyridin oder monomere Detergentien, beschleunigten die Denaturierung. Substanzen, die die Gleichgewichte in die entgegengesetzte Richtung verschieben, wie Zink und andere zweiwertige Metallionen, verzögerten die Denaturierung. Aber selbst eine Kombination aller günstigen Bedingungen konnte die Denaturierung von Insulin nicht verhindern. Diese Denaturierung war auch, wenn auch langsamer, bei ruhender Lagerung der Lösungen zu beobachten.

Eine spezielle Form der hydrophoben Grenzflächen bildet sich beim Gefrieren von wäßrigen Lösungen, z.B. bei der Gefriertrocknung von Proteinen. An diesen Grenzflächen kommt es ebenfalls zu den beschriebenen Denaturierungen von Proteinen (U.B. Hansson, Acta Chem.Scand., 22, 483 (1968)).

Der Denaturierungsprozeß kann einem Protein immunogene Eigenschaften (d.h. die Fähigkeit, immunologische Abwehrreaktionen in einem Organismus zu induzieren,) verleihen oder bereits vorhandene immunogene Eigenschaften verstärken. 5 Außerdem können biologische Eigenschaften, wie enzymatische, serologische oder hormonelle Aktivitäten, verändert oder zerstört werden.

Es ist ferner bekannt, daß man die Adsorption von Proteinen 10 an die Grenzfläche, die sich zwischen einer wäßrigen Lösung und einer flüssigen hydrophoben Phase ausbildet, dadurch verhindern kann, daß man diesem System monomere oberflächenaktive Substanzen, wie Alkylalkohole zusetzt (R. Cecil und C.F. Louis, Biochem.J. 117, 147 (1970)).

15 Diese Substanzen werden ihrerseits reversibel an die hydrophoben Grenzflächen adsorbiert und verdrängen so die Proteine. Nachteilig bei diesem Verfahren ist, daß die Anwendungskonzentration der oberflächenaktiven Substanzen nahe deren Sättigungsgrenze in wäßriger Lösung liegen muß, 20 denn nur so wird eine optimale Beladung der Grenzfläche gewährleistet. In vielen Fällen ist die Größe der Grenzfläche nicht konstant, sondern variabel (z.B. die Grenzfläche Lösung/Luft beim Rühren oder Schütteln von Proteinlösungen), so daß die wäßrige Lösung Moleküle dieser oberflächenaktiven Substanzen abwechselnd nachliefern und auf- 25 nehmen muß, d.h. einen Puffervorrat enthalten muß. Bei einer notwendigen Anwendungskonzentration nahe der Sättigungsgrenze ist dies jedoch nur begrenzt möglich

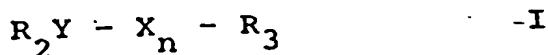
30 Ein weiterer Nachteil dieses Verfahrens ist ferner, daß die erwähnten monomeren oberflächenaktiven Substanzen nicht nur an den hydrophoben Grenzflächen adsorbiert werden, sondern auch an den hydrophoben Bereichen der gelösten Proteine. Dort bewirken sie eine Denaturierung der 35 gelösten Proteine, die in vielen Fällen irreversibel ist und die man gerade verhindern will.

Die Stärke der Bindung der monomeren oberflächenaktiven Substanzen sowohl an die hydrophoben Grenzflächen als auch an die hydrophoben Bereiche der gelösten Proteine ist von der Hydrophobizität der Substanzen, d.h. z.B. von der Länge der Alkylketten abhängig. Je länger die Alkylkette, um so größer die Bindungsstärke. Der Widerspruch zwischen einer möglichst vollständigen Beladung der Grenzflächen mit den oberflächenaktiven Substanzen (erreichbar durch hohe Hydrophobizität der Substanzen oder hoher Anwendungskonzentration) und möglichst geringer Bindung an die hydrophoben Bereiche der gelösten Proteine schien nicht lösbar zu sein.

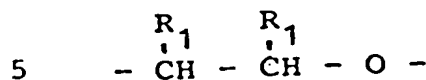
Es wurde nun gefunden, daß polymere Substanzen mit alternierend angeordneten hydrophoben und hydrophilen Bereichen die Grenzflächen derart verändern, daß die Adsorption von Proteinen an diese Grenzflächen und dadurch auch die erwähnten Sekundärreaktionen wie z.B. die Grenzflächenaggregation wirksam verhindert werden.

Gegenstand der Erfindung ist demgemäß eine wäßrige Proteinlösung, gekennzeichnet durch einen Gehalt an einer oberflächenaktiven Substanz mit kettförmiger Grundstruktur, deren Glieder schwach hydrophobe und schwach hydrophile Bereiche in alternierender Anordnung enthalten. Insbesondere sind Gegenstand der Erfindung wäßrige Insulinlösungen ggf. mit üblichen Zusätzen zur Einstellung der Isotonie, Konservierung und/oder Depot-Wirkung, die durch den Zusatz einer solchen oberflächenaktiven Substanz gekennzeichnet sind.

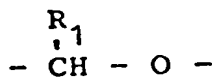
Bevorzugt als oberflächenaktive Substanzen im Sinne der Erfindung sind Homo-, Misch- oder Blockpolymerisate der Formel I



in der X_n eine Kette von n Gliedern der Formeln II oder III



II



III

in beliebiger Reihenfolge und n 2 - 80, vorzugsweise 8 - 45 ist,

10 Y -O- oder -NH- ist,

R_1 H, -CH₃ oder -C₂H₅ ist, wobei die Reste R_1 gleich oder verschieden sein können, jedoch mindestens in der Hälfte der Kettenglieder X -CH₃ oder -C₂H₅ vorkommt, und in der R_2 und R_3 unabhängig voneinander H oder ein organischer
15 Rest sind.

Besonders bevorzugt sind Verbindungen der Formel I, in denen R_3 Alkyl mit 1 - 20 C-Atomen, Carboxyalkyl mit 2 - 20 C-Atomen oder Alkylphenyl mit 1 - 10 Alkyl-C-Atomen bedeutet. R_2 bedeutet in den bevorzugten Verbindungen ebenfalls
20 Alkyl mit 1 - 20 C-Atomen, im Falle Y = -O- aber auch Carboxalkyl mit 2 - 20 C-Atomen oder Alkylphenyl mit 1 - 10 Alkyl-C-Atomen.

25 Beispiele für die Reste R_2 und R_3 sind Methoxy, Äthoxy, Propoxy, Butoxy, oder die Reste, die sich von Laurylalkohol oder Myristylalkohol ableiten; Carboxalkylgruppen, die sich von der Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Palmitinsäure oder Stearinsäure ableiten, Nonylphenoxy, Oleyl-
30 amino oder Stearylamo.

R_2 oder R_3 kann sich auch von einem mehrwertigen Alkohol wie Glycerin oder Pentaerytrit oder einer mehrwertigen

Carbonsäure wie Citronsäure oder einem mehrwertigen Amin wie Äthylendiamin ableiten. Mehr funktionelle Glieder R_2 oder R_3 können mit zwei oder mehreren Polyalkoxyketten der oben gezeigten Art verbunden sein, wobei verzweigte
5 Produkte entstehen.

Die Herstellung der erfindungsgemäß zu verwendenden oberflächensaktiven Substanzen werden in an sich bekannter Weise durch kontrollierte Addition von Alkylenoxiden an
10 Alkylendiglykole (oder an mehrwertige Alkohole oder Amine z.B. Pentaerythrit oder Äthylendiamin, zur Darstellung von verzweigten Produkten) hergestellt. Die endständige Hydroxylfunktionen können gegebenenfalls anschließend verestert oder veräthert werden. Eine allgemeine Vor-
15 schrift zur Herstellung eines geeigneten Blockpolymerisats ist in Beispiel 1a beschrieben.

Die erfindungsgemäßen oberflächensaktiven Substanzen zeichnen sich dadurch aus, daß sie schon in Konzentrationen von 2-200 ppm in wäßrigen Medien wirksam sind. Man kann sich vorstellen, daß diese Substanzen an der Grenzfläche so geformt sind, daß ihre hydrophoben Reste in die hydrophobe Phase ragen und die alternierend angeordneten hydrophilen Reste in die wäßrige Phase. Da die Hydrophobizität
25 der einzelnen hydrophoben Reste relativ schwach ist, dürfte auch die Bindung dieser einzelnen hydrophoben Reste an fremde hydrophobe Strukturen, z.B. an die hydrophoben Bereiche gelöster Proteine, so schwach sein, daß sie bei den
30 erfindungsgemäßen Anwendungskonzentrationen vernachlässigt werden können. Erst die Summe aller Bindungen der einzelnen hydrophoben Reste an eine größere hydrophobe Fläche (Grenzfläche, gegen die die hydrophoben Bereiche der gelösten Proteine sehr klein sind) bewirkt, daß diese Sub-
35 stanzen auch bei geringer Anwendungskonzentration die Grenzflächen optimal bedecken.

Die Molekülform, die die erfindungsgemäßen oberflächenaktiven Substanzen in wäßriger Lösung zeigen, dürfte sich von der Form, die sie an der Oberfläche annehmen unterscheiden. In wäßriger Lösung ist die polymere Kette so ge-
5 formt, daß die einzelnen hydrophoben Bereiche sich gegenseitig absättigen und die hydrophilen Bereiche nach außen in die wäßrige Umgebung ragen. Dies bewirkt eine ausreichend hohe Löslichkeit in wäßrigen Medien, so daß ein genügend großer Vorratspuffer vorhanden ist, der auch bei
10 ständiger Änderung der Größe der Grenzflächen eine optimale Beladung der Grenzflächen mit den erwähnten Substanzen ermöglicht.

Die Behinderung der Adsorption und Denaturierung durch
15 die erfindungsgemäßen Zusätze ist umso überraschender, als gerade, wie oben beschrieben, ein Zusatz von monomeren löslichen oberflächenaktiven Stoffen (Detergentien), die Denaturierung von Proteinlösungen, insbesondere Insulin beschleunigt.

20 Die erwähnten polymeren oberflächenaktiven Substanzen kann man entweder einer Proteinlösung zumischen oder man kann die Oberflächen, die mit Proteinlösungen in Berührung kommen sollen, mit diesen oberflächenaktiven Substanzen
25 vorbehandeln.

Der Zusatz der erwähnten polymeren oberflächenaktiven Substanzen zu Proteinlösungen ist nicht auf Lösungen für
therapeutische Zwecke begrenzt. Man kann diese Substanzen
30 auch Proteinlösungen während des Herstellungs- und Reinigungsprozesses von Proteinen zusetzen zur Vermeidung von Adsorption und Denaturierung an Grenzflächen, insbesondere bei der Gelchromatographie und Ultrafiltration von Proteinlösungen.

Die Denaturierung von Insulin ist ein reversibler Prozeß. Durch Behandeln des denaturierten Insulins mit leicht löslichen Detergentien (z.B. Natriumdodecylsulfat), mit wäßrigen alkalischen Medien oberhalb pH 10,5 oder mit konzentrierter Trifluoressigsäure konnten die denaturierten Produkte renaturiert werden. Es ist also möglich, die geringen Anteile von denaturiertem Insulin in den Insulinen, wie sie beim üblichen Herstellungsprozeß anfallen, unter den genannten Bedingungen zu renaturieren, bevor man die Lösungen dieser Produkte mit den erfindungsgemäßen oberflächenaktiven Substanzen in Berührung bringt.

Insulinlösungen für therapeutische Zwecke können nach folgender allgemeiner Herstellungsvorschrift hergestellt werden:

Bis zu 1 500 000 I.E. Rinder-, Schweine- oder Humaninsulin oder eines Des-B1-Phenylalanin-Derivates dieser Insuline, das bis zu 0,8 Gewichtsprozent Zink enthalten kann, werden in 400 ml Wasser unter Zugabe von 1 n Salzsäure gelöst. Diese Lösung wird mit 500 ml einer Lösung gemischt, die ein Konservierungsmittel, z.B. Phenol, Kresol oder p-Hydroxybenzoesäuremethylester, ein Mittel zur Einstellung der Isotonie, z.B. Natriumchlorid, Glycerin, Glucose oder ein ähnliches Kohlenhydrat und ein Salz zur Pufferung des pH-Wertes z.B. Natriumphosphat, Acetat, Citrat, Veronalnatrium oder Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan enthält. Daneben kann diese Lösung noch einen Depothilfsstoff, wie Surfen, zur Erzielung einer verzögerten Insulinwirkung enthalten. Mit 1 n Salzsäure oder 1 n Natronlauge wird ein pH-Wert von 3,0 - 4,0 oder 6,8 - 7,5 eingestellt. Anschließend werden 50 ml einer wäßrigen Lösung, die 2 - 200 mg einer der erfindungsgemäßen oberflächenaktiven Substanzen enthält, zugefügt. Die Lösung wird mit Wasser auf 1,000 l ergänzt.

Eine solche Insulinlösung für therapeutische Zwecke kann mit einer Suspension, die amorphes oder kristallines Insulin mit verzögerter Wirkung enthält, gemischt werden.

5 Beispiel 1

(a) In einem 10 l-Glaskolben mit Rührer, Heizbad, Rückflußkühler und einer Einrichtung zur Dosierung von Alkylenoxiden unter Stickstoff werden 152,1 g Propylen-
glykol und 125 g 40 %ige Kalilauge vorgelegt. Durch Va-
kuumdestillation wird entwässert. Anschließend werden
bei 120 °C langsam unter Rühren nacheinander 4141 g Pro-
pylenoxid und 476 g Äthylenoxid zugegeben. Nach beendeter
Reaktion wird durch Zugabe von Milchsäure das Kaliumhy-
droxid neutralisiert. Durch Vakuumdestillation werden die
leichtflüchtigen Anteile abgetrennt und das Produkt ent-
wässert. Das mittlere Molekulargewicht des Produktes
beträgt 2000 Dalton bei einem Gehalt an Polyoxyäthylen
von 10 Gew.-% im Molekül.

20

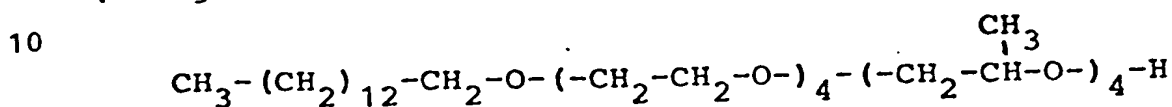
(b) 2 Proben mit jeweils 10 ml einer 0,1 %igen Lösung
von Rinderserum-Albumin bzw. Human-Albumin in 0,01 M Phos-
phatpuffer, pH 7, und 2 gleiche Proben mit Zusatz eines
Stabilisators von 10 ppm (bezogen auf das Gewicht der Lö-
sung) eines Blockpolymerisats bestehend aus einer linearen
Kette von Polypropylenglykol mit einem mittleren Moleku-
largewicht von 1750 Dalton, der beidseitig jeweils 5 %
Polyäthylenglykol anpolymerisiert waren, wurden bei 37 °C
geschüttelt. Die beiden ersten Proben zeigten nach 7 Tagen
bzw. 30 Tagen eine starke Trübung, hervorgerufen durch
denaturiertes Protein. Die beiden Proben, die den Stabi-
lisator enthielten, waren nach mehreren Monaten noch klar.

35

Beispiel 2

10 Proben mit jeweils 10 ml einer 0,01 %igen Lösung des
Enzyms β -Galaktosidase aus E.coli in 0,01 M Phosphatpuffer,

pH 7, mit 3×10^6 μ U/ml wurden stufenweise mit 10-100 mg Silikonöl AK 350 versetzt. Die Suspensionen wurden 48 Stunden bei 5 °C geschüttelt. Dabei bildete sich eine Emulsion, die sich durch Ultrazentrifugation (40 000 g, 30 Minuten, 4 °C) in 2 Phasen trennen ließ. In der wäßrigen Phase wurde die Enzymaktivität bestimmt. Es zeigte sich, daß die Silikonölemulsion bis zu 70 % des Enzyms adsorbiert hatte. Die Wiederholung des Versuchs in Gegenwart von 100 ppm (bezogen auf das Gewicht der Lösung) folgender Verbindung



ergab, daß in Gegenwart dieser oberflächenaktiven Verbindung keine Enzymaktivität an das Silikonöl adsorbiert wurde.

15 Beispiel 3

10 ml einer wäßrigen Suspension von Polystyrol-Kugeln (Dow-Latex^(R)) mit einem mittleren Durchmesser von 0,481 μ m wurden in zwei gleiche Teile geteilt. Während der erste Teil unbehandelt blieb, wurde der zweite Teil mit 50 mg eines Blockpolymerisats bestehend aus einer linearen Kette von Polypropylenglykol mit einem mittleren Molekulargewicht von 2250 Dalton, der beidseitig jeweils 5 % Polyäthylenglykol anpolymerisiert waren, bei Raumtemperatur 2 Tage geschüttelt. Anschließend wurde der Überschuß durch Dialyse gegen eine wäßrige Lösung, die 20 ppm dieser polymeren oberflächenaktiven Substanz enthielt, entfernt.

Von den in der nachstehenden Tabelle angegebenen Proteinen wurden je 2 x 3 ml einer Lösung der genannten Konzentration in Phosphatpuffer pH 7 hergestellt. Jede dieser Lösungen wurde bei 5 °C mit jeweils 500 μ l der unbehandelten und der wie oben beschrieben vorbehandelten Polystyrol-Suspension geschüttelt. Anschließend wurde jede Probe durch ein 0,2 μ m Filter klarfiltriert. Die Tabelle gibt die Proteinkonzentrationen in den Filtraten an:

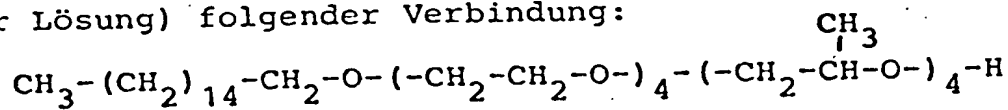
Protein	Proteinkonzentration in den Lösungen		
	A	B	C
Human- γ -Globulin	1,2 mg/ml	1,2 mg/ml	0,2 mg/ml
Ei-Albumin	0,5 mg/ml	0,50 mg/ml	0,22 mg/ml
5 Lysozym	1,0 mg/ml	0,95 mg/ml	0,25 mg/ml
Secretin	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml	0,3 mg/ml
Glucagon	1,0 mg/ml	0,9 mg/ml	0,3 mg/ml
Insulin	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml	0,2 mg/ml

- 10 A = 3 ml der eingesetzten Proteinlösungen + 450 μ l Puffer
 B = nach Kontakt mit vorbehandelten Polystyrolflächen
 C = nach Kontakt mit unbehandelten Polystyrolflächen

15 Dieser Versuch wurde bei 37 °C wiederholt. Dabei wurden zusätzlich die Filtrate durch Gelchromatographie in einer Säule untersucht. Es zeigte sich, daß diejenigen Proteinlösungen, die mit den unbehandelten Polystyrolkugeln in Kontakt waren, hochmolekulare Aggregate enthielten. In den Proteinlösungen, die mit den vorbehandelten Polystyrolkugeln in Kontakt waren, wurden solche Aggregate nicht gefunden.

Beispiel 4

25 5 Proben mit jeweils 10 ml einer 0,1 %igen Lösung von Glucagon in 0,05 M Tris/HCl-Puffer pH 8,0 und 5 gleiche Proben mit einem Zusatz von 50 ppm (bezogen auf das Gewicht der Lösung) folgender Verbindung:



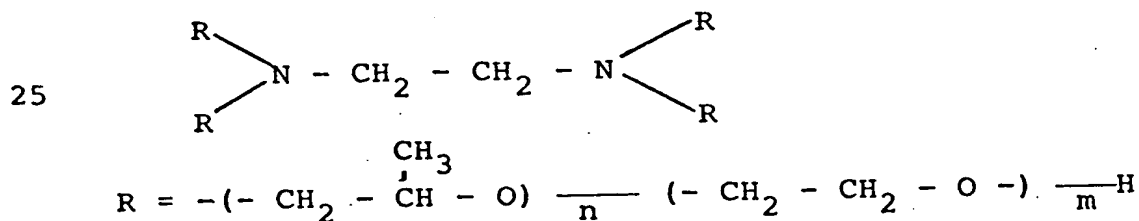
30 wurden bei Raumtemperatur geschüttelt. Die ersten 5 Proben zeigten nach 4 Tagen eine Trübung, verursacht durch ausgefallenes denaturiertes Protein. Diejenigen Proben, denen die oberflächenaktive Substanz zugesetzt worden war, blieben mehrere Wochen klar.

Beispiel 5

Ampullen mit 1 - 5 ml je einer 0,1 %igen Lösung der Peptidhormone Secretin, Calcitonin, Glucagon, Gastrin, Adrenocorticotropes Hormon (ACTH), Bradykinin, Cholecystokin (CCK), Gastrin Inhibierendes Polypeptid (GIP), Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP) und Luteinisierungs-Releasing-Hormon (LHR) in 0,05 M Tris/HCl-Puffer pH 7,5 und gleiche Proben mit einem Zusatz von 10 ppm (bezogen auf das Gewicht der Lösung) eine Blockpolymerisats bestehend aus einer linearen Kette von Polypropylenglykol mit einem mittleren Molekulargewicht von 2000 Dalton, der beidseitig jeweils 5 % Polyäthylenglykol anpolymerisiert waren, wurden bei 37 °C geschüttelt. Die Proben ohne Stabilisator zeigten nach einigen Tagen eine starke Trübung, hervorgerufen durch denaturiertes Protein. Die stabilisierten Proben waren auch nach mehreren Monaten noch klar.

Beispiel 6

0,1 %ige Lösungen von Ei-Albumin, Human-Immunglobulin-G, bzw. Myoglobin vom Wal in 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7, und gleiche Lösungen mit einem Zusatz von 0,1 % (bezogen auf das Gewicht der Lösung) folgender Verbindung:



wobei n und m so gewählt wurden, daß ein mittleres Gesamtmolekulargewicht der obigen Verbindung von 12 500 Dalton resultierte und daß der Äthylenoxidanteil davon 40 % betrug, wurden durch Ultrazentrifugation (z.B. 1000 g/ 90 Minuten) von Aggregaten befreit. Ampullen mit jeweils 10 ml dieser Lösungen wurden bei 37 °C geschüttelt. Die Proben ohne Stabilisator zeigten nach wenigen Stunden eine starke Trübung, verursacht durch ausgefallenes denaturiertes Protein. Diejenigen Proben, denen die oberflächenaktiven Substanzen zugesetzt worden war, blieben mehrere Monate klar und zeigten in der analy-

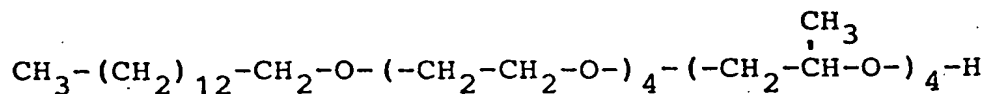
tischen Ultrazentrifuge keine neuen Aggregate.

Beispiel 7

Kristallisiertes Rinderinsulin (40 000 I.E.) mit 0,5
 5 Gewichtsprozent Zink wurde in 200 ml Wasser unter Zugabe
 von 3 ml 1 n Salzsäure gelöst. Diese Lösung wurde mit
 700 ml einer Lösung von 1 g p-Hydroxybenzoesäuremethyl-
 ester, 16 g Glycerin und 1,4 g Natriumacetat $\cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ ver-
 setzt. Die Lösung wurde mit 1 n Natronlauge auf pH 6,9 -
 10 7,4 eingestellt. Nach Zugabe von 5 ml einer wäßrigen 0,1
 %igen Lösung von linearem Polypropylenglykol mit einem
 mittleren MG von 2000 Dalton wurde mit Wasser auf 1,000 l
 aufgefüllt und die Lösung sterilfiltriert.

15 Beispiel 8

Kristallisiertes Des-B1-Phenylalanininsulin vom Rind
 (100 000 I.E.) mit 0,6 Gewichtsprozent Zink wurde in
 200 ml Wasser unter Zugabe von 3 ml 1 n Salzsäure gelöst.
 20 Diese Lösung wurde mit 700 ml einer Lösung von 2 g Phenol,
 17 g Glycerin und 6,057 g Tris-(hydroxymethyl)-amino-
 methan, die mit 35 ml 1 n Salzsäure auf pH 7,6 eingestellt
 worden war, versetzt. Die Lösung wurde auf pH 7,2 - 7,6
 eingestellt. Nach Zugabe von 10 ml einer wäßrigen 1 %igen
 25 Lösung der Verbindung



wurde mit Wasser auf 1,000 l aufgefüllt und die Lösung
 30 sterilfiltriert.

Beispiel 9

Amorphes Rinderinsulin (1 000 000 I.E.) mit 0,8 Gewichts-
 35 prozent Zink wurde in 400 ml Wasser unter Zugabe von 5 ml
 1 n Salzsäure gelöst. Diese Lösung wurde mit 500 ml einer
 Lösung von 2,5 g Phenol, 16 g Glycerin und 1,78 g Na_2HPO_4

• 2 H₂O versetzt. Die Lösung wurde auf pH 7,2 - 7,5 eingestellt. Nach Zugabe von 5 ml einer wäßrigen 0,1 %igen Lösung von linearem Polypropylenglykol mit einem mittleren MG von 1750 Dalton wurde mit Wasser auf 1,000 l aufgefüllt und die Lösung sterilfiltriert.

Beispiel 10

Rinderinsulin (40 000 I.E.), das in Gegenwart von einem Blockpolymerisat, bestehend aus einer linearen Kette von Polypropylenglykol mit einem mittleren MG von 1750 Dalton, der beidseitig jeweils 5 % Polyäthylenglykol anpolymerisiert waren, durch Chromatographie gereinigt worden war und 0,6 Gewichtsprozent Zink enthielt, wurde in 200 ml Wasser unter Zugabe von 3 ml 1 n Salzsäure gelöst. Diese Lösung wurde mit 700 ml einer Lösung von 2,5 g m-Kresol, 50 g Glucose, 1,4 g Natriumacetat · 3H₂O und 10 mg des oben genannten Blockpolymerisats versetzt. Die Lösung wurde mit 1 n Natronlauge auf pH 6,9 - 7,4 eingestellt, mit Wasser auf 1,000 l ergänzt und sterilfiltriert.

Beispiel 11

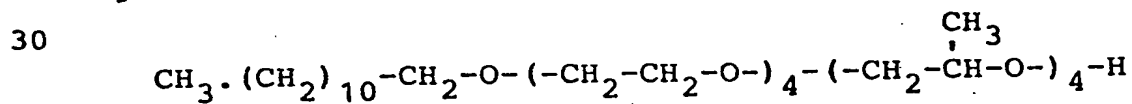
Kristallisiertes Schweineinsulin (40 000 I.E.) mit 0,6 Gewichtsprozent Zink wurde in 200 ml Wasser unter Zugabe von 3ml 1 n HCl gelöst. Diese Lösung wurde mit 700 ml einer Lösung von 1 g p-Hydroxybenzoesäuremethylester, 17 g Glycerin, 1,4 g Natriumacetat · 3 H₂O und 10 mg linearem Polypropylenglykol mit einem mittleren MG von 1750 Dalton versetzt. Die Lösung wurde auf pH 6,9 - 7,4 eingestellt. Mit Wasser wurde auf 1,000 l ergänzt und die Lösung sterilfiltriert.

Beispiel 12

Kristallisiertes Rinderinsulin (450 000 I.E.), das in Gegenwart eines Blockpolymerisats, bestehend aus einer linearen Kette von Polypropylenglykol mit einem mittleren MG von 1750 Dalton, der beidseitig jeweils 5 % Polyäthylenglykol anpolymerisiert waren, durch eines der üblichen Chromatographie-Verfahren gereinigt worden war und 0,5 Gewichtsprozent Zink enthielt, wurde in 400 ml 0,03 n Salzsäure gelöst und diese Lösung mit einer Lösung von 150 mg ZnCl_2 und 5 mg des für die Chromatographie verwendeten Blockpolymerisats in 100 ml 0,03 n HCl versetzt. Die Lösung wurde sterilfiltriert und mit 500 ml einer ebenfalls sterilfiltrierten Lösung von 70 g NaCl, 14 g Natriumacetat $\cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, 5 mg des für die Chromatographie verwendeten Blockpolymerisats und 10 ml 1 n NaOH in Wasser gemischt. Die Mischung wurde auf pH 5,4 eingestellt und 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, wobei das Insulin in Rhomboedern kristallisierte. Die Kristallsuspension wurde mit 10,25 l einer sterilen Lösung von 20 g NaCl, 1,75 g Natriumacetat $\cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, 11,25 g p-Hydroxybenzoesäuremethylester und 102,5 mg des für die Chromatographie verwendeten Blockpolymerisats versetzt. Durch Zutropfen von 1 n NaOH wurde pH 6,9 - 7,3 eingestellt.

Beispiel 13

Kristallisiertes Rinderinsulin (40 000 I.E.), das in Gegenwart der Verbindung



durch eines der üblichen Chromatographieverfahren gereinigt worden war und 0,5 Gewichtsprozent Zink enthielt, wurde in 200 ml Wasser unter Zugabe von 3 ml 1 n Salzsäure gelöst. Diese Lösung wurde mit 700 ml einer Lösung von 1 g p-Hydroxybenzoesäuremethylester, 50 g Glucose, 0,175 g

Surfen und 100 mg der gleichen Substanz wie für die Chromatographie verwendet, versetzt. Die Lösung wurde gegebenenfalls mit 1 n HCl oder 1 n NaOH auf pH 3,3 - 3,5 eingestellt, mit Wasser auf 1,000 l ergänzt und steril-

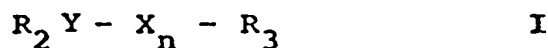
5

filtriert.

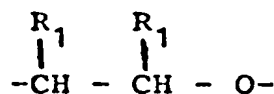
Patentansprüche:

(1) Wäßrige Proteinlösung gekennzeichnet durch einen Gehalt an einer oberflächenaktiven Substanz mit kettenförmiger Grundstruktur, deren Glieder schwach hydrophobe und schwach hydrophile Bereiche in alternierender Anordnung enthalten.

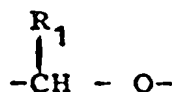
(2) Wäßrige Proteinlösung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die oberflächenaktive Substanz ein Homopolymerisat, Mischpolymerisat oder Blockpolymerisat der Formel I ist,



in der X_n eine Kette von n Gliedern der Formeln II oder III



II



III

in beliebiger Reihenfolge und n 2-80, vorzugsweise 8-45 ist,

Y -O- oder -NH- ist,

R_1 H, $-CH_3$ oder $-C_2H_5$ ist, wobei die Reste R_1 gleich oder verschieden sein können, jedoch mindestens in der Hälfte der Kettenglieder X $-CH_3$ oder $-C_2H_5$ vorkommt, und in der

R_2 und R_3 unabhängig voneinander H oder ein organischer Rest sind.

(3) Wäßrige Proteinlösung gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß R_2 und R_3 je Alkyl mit 1-20 C-Atomen, Carboxalkyl mit 2-20 C-Atomen oder Alkylphenyl

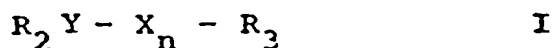
mit 1 - 10 Alkyl-C-Atomen bedeuten, R_2O jedoch, falls Y -NH- bedeutet, nur Alkyl mit 1 - 20 C-Atomen sein kann.

- 5 (4) Wäßrige Proteinlösung gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß R_2 und/oder R_3 mehrwertig sind und mit zwei oder mehreren Polyalkoxyketten $-X_n$ zu verzweigten Produkten verbunden sind.
- 10 (5) Wäßrige Proteinlösung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein Insulin ist und daß die Lösung gegebenenfalls die bei Insulinlösungen üblichen Zusätzen zur Einstellung der Isotonie, Konservierung und/oder Depot-Wirkung, enthält.
- 15 (6) Verfahren zur Herstellung einer stabilen Proteinlösung dadurch gekennzeichnet, daß man einer wäßrigen Proteinlösung eine oberflächenaktive Substanz gemäß Ansprüchen 1 - 4 zusetzt.
- 20 (7) Verfahren zur Herstellung einer Insulinlösung, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Lösung aus Rinder-, Schweine- oder Humaninsulin oder einem Des-B1- Phenylalaninderivat dieser Insuline, die bis zu 0,8 % Zink, bezogen auf das Insulingewicht, enthält, mit einer
- 25 Lösung, die eine Verbindung der Formel I enthält, mischt und gegebenenfalls ein Mittel zur Einstellung der Isotonie wie Glycerin, Natriumchlorid, Glucose oder ein ähnliches Kohlenhydrat, zur Konservierung
- 30 einen Zusatz von Phenol, Kresol oder p-Phydroxybenzoesäuremethylester, zur Pufferung des pH-Wertes Natriumphosphat, Acetat, Citrat, Veronalnatrium oder Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan zusetzt.
- 35 (8) Verfahren zur Herstellung eines Insulinpräparates mit Depotwirkung, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Insulinlösung, hergestellt gemäß Anspruch 7, mit einer verzögert wirkenden Depotkomponente des Insulins versetzt.

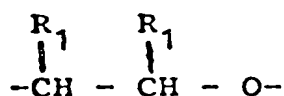
- (9) Verfahren zur Behandlung von hydrophoben Oberflächen zur Beseitigung ihrer adsorbierenden und denaturierenden Wirkung auf Proteine dadurch gekennzeichnet, daß man die Oberflächen mit einer wäßrigen Lösung einer oberflächenaktiven Substanz gemäß Ansprüchen 1 - 4 behandelt.
- (10) Verwendung von Lösungen nach Anspruch 1 - 4 bei der Reinigung von Proteinen durch Chromatographie oder Ultrafiltration.
- (11) Verwendung von Lösungen nach Anspruch 5 zum Zwecke der Reinigung von Insulin durch Chromatographie oder Kristallisation.
- (12) Verwendung von Lösungen nach Anspruch 5 zur Vermeidung der Adsorption von Insulin an hydrophoben Oberflächen.
- (13) Verwendung von oberflächenaktiven Substanzen gemäß Ansprüchen 1 - 4 zur Vorbehandlung von hydrophoben Oberflächen zur Vermeidung der Adsorption oder Denaturierung von Proteinen, insbesondere Insulin.

Patentansprüche für Österreich:

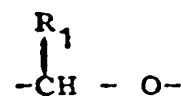
1. Verfahren zur Herstellung einer stabilen Proteinlösung, dadurch gekennzeichnet, daß man einer wäßrigen Proteinlösung eine oberflächenaktive Substanz mit kettenförmiger Grundstruktur, deren Glieder schwach hydrophobe und schwach hydrophile Bereiche in alternierender Anordnung enthalten, zusetzt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die oberflächenaktive Substanz ein Homopolymerisat, Mischpolymerisat oder Blockpolymerisat der Formel I ist



in der X_n eine Kette von n Gliedern der Formeln II oder III



II



III

20

in beliebiger Reihenfolge und n 2-80, vorzugsweise 8-45 ist,

Y -O- oder -NH- ist,

R_1 H, -CH₃ oder -C₂H₅ ist, wobei die Reste R_1 gleich oder verschieden sein können, jedoch mindestens in der Hälfte der Kettenglieder X -CH₃ oder -C₂H₅ vorkommt, und in der

R_2 und R_3 unabhängig voneinander H oder ein organischer Rest sind.

3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß R_2 und R_3 je Alkyl mit 1-20 C-Atomen, Carboxalkyl mit 2-20 C-Atomen oder Alkylphenyl mit 1 - 10 Alkyl-C-Atomen bedeuten, R_2 jedoch, falls Y -NH- bedeutet, nur

Alkyl mit 1 - 20 C-Atomen sein kann.

4. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet,
daß R_2 und/oder R_3 mehrwertig sind und mit zwei oder
mehreren Polyalkoxyketten $-X_n$ zu verzweigten Produkten
verbunden sind.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß das Protein Insulin ist und daß die Lösung gegeben-
enfalls die bei Insulinlösungen üblichen Zusätzen
zur Einstellung der Isotonie, Konservierung und/oder
Depot-Wirkung, enthält.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet,
daß man eine Lösung aus Rinder-, Schweine- oder
Humaninsulin oder einem Des-B1- Phenyl-
alaninderivat dieser Insuline, die bis zu 0,8 % Zink,
bezogen auf das Insulingewicht, enthält, mit einer
Lösung, die eine Verbindung der Formel I enthält,
mischt und gegebenenfalls ein Mittel zur Einstellung
der Isotonie wie Glycerin, Natriumchlorid, Glucose
oder ein ähnliches Kohlenhydrat, zur Konservierung
einen Zusatz von Phenol, Kresol oder p-Phydroxyben-
zoesäuremethylester, zur Pufferung des pH-Wertes
Natriumphosphat, Acetat, Citrat, Veronalnatrium oder
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan zusetzt.
7. Verfahren zur Herstellung eines Insulinpräparates mit
Depotwirkung, dadurch gekennzeichnet, daß man eine
Insulinlösung, hergestellt gemäß Anspruch 6, mit einer
verzögert wirkenden Depotkomponente des Insulins ver-
setzt.
8. Verfahren zur Behandlung von hydrophoben Oberflächen
zur Beseitigung ihrer adsorbierenden und denaturie-
renden Wirkung auf Proteine, dadurch gekennzeichnet,
daß man die Oberflächen mit einer wäßrigen Lösung
einer oberflächenaktiven Substanz gemäß Ansprüchen 1 -
4 behandelt.

9. Verwendung von Lösungen nach Anspruch 1 - 4 bei der Reinigung von Proteinen durch Chromatographie oder Ultrafiltration.
- 5 10. Verwendung von Lösungen nach Anspruch 5 zum Zwecke der Reinigung von Insulin durch Chromatographie oder Kristallisation.
11. Verwendung von Lösungen nach Anspruch 5 zur Vermeidung der Adsorption von Insulin an hydrophoben Oberflächen.
- 10 12. Verwendung von oberflächenaktiven Substanzen gemäß Ansprüchen 1 - 4 zur Vorbehandlung von hydrophoben Oberflächen zur Vermeidung der Adsorption oder Denaturierung von Proteinen, insbesondere Insulin.



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 80 10 2252.6

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	betrifft Anspruch	
	DE - A - 2 212 695 (HOECHST) * Anspruch *	10,11	A 61 K 37/02 A 61 K 37/26 C 07 C 103/52
A	DE - A1 - 2 641 819 (YAMANOUCI) * Anspruch 1 *	1,2,4	C 07 G 7/00 C 09 K 15/14
A	DE - A1 - 2 620 483 (TAKEDA) * Anspruch 1 *	1,2,4	
P	US - A - 4 179 337 (F.F. DAVIS et al.) * Abstract *	1	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.)
D	BIOCHEMICAL JOURNAL, Band 117, 1970 Cambridge R. CECIL et al. "Protein-Hydrocarbon Interactions" Seiten 147 bis 156	1	A 61 K 37/02 A 61 K 37/26 C 07 C 103/52 C 07 G 7/00 C 09 K 15/04 C 09 K 15/06 C 09 K 15/16 C 09 K 15/20
A	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, Band 541, 1978 B. SCHOBERT et al. "Unusual Solution Properties of Proline and its Interaction with Proteins" Seiten 270 bis 277	1	KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE
X Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			X: von besonderer Bedeutung A: technologischer Hintergrund O: nichtschriftliche Offenbarung P: Zwischenliteratur T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: kollidierende Anmeldung D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus andern Gründen angeführtes Dokument &: Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument
Recherchenort Berlin		Abschlußdatum der Recherche 03-07-1980	Prüfer KNAACK